2014 年 9 月作成（第 1 版）

微生物検出用　イムノクロマトキット
大腸菌 O157

本キットは、大腸菌 O157 に対するモノクローナル抗体を用いた金コロイド免疫クロマト法により、食品からの大腸菌 O157 を検出する検査キットです。

検査にあたっては本取扱説明書をよく読み、操作方法に従い正しく検査してください。
本キットは食品からの大腸菌 O157 検出のための研究用試薬であり、臨床検査薬などではありません。

キットの内容

包装単位：20 テスト／キット

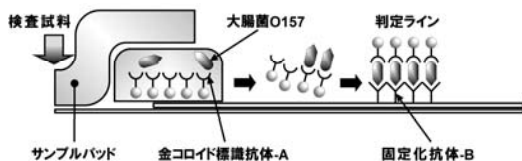
	名　　称	構 成
A	テストストリップ （透明プラ袋個包装、板状乾燥剤入り）	20 本
B	添加液	600 µL×2 本
C	取扱説明書	1 枚

目　　的

食品からの大腸菌 O157 検出[*1]

*1: **本キットは大腸菌 O157 検出用の試薬であり、ベロ毒素産生性の有無は確認できません。**

原　　理

1. 検査試料中に大腸菌 O157 が含まれる場合、検査試料にテストストリップをつけると、試薬紙中の金コロイド標識抗体 A と大腸菌 O157 が複合体を形成します。
2. 複合体はテストストリップ上を移動し、固定化抗体 B に捕捉され、赤紫色の判定ラインが確認されます。
3. 大腸菌 O157 が含まれない場合は、複合体が形成されないため、判定ラインは確認されません。

操作方法 1: 試料溶液の調製

1.準備するもの［例］

- 電子天秤
- オートクレーブ
- インキュベーター
- ストマッカー袋（フィルター付を推奨）
- ストマッカー
- 2.0 mL 滅菌済みチューブ（耐熱性のもの）
- 滅菌済みチップ（フィルター付を推奨）
- マイクロピペッター
- ボルテックスミキサー
- ウォーターバスまたはヒートブロック（約 100℃加熱が可能なもの）
- タイマー
- 増菌用培地
- 精製水
- ノボビオシンナトリウム

2.増菌用培地の準備

本キットでは、ノボビオシンナトリウムを 15 mg/L となるように添加した TA10 Broth[*2] による培養方法または通知法及び ISO 法に準じた培養方法で大腸菌 O157 を検出することが可能です。

ノボビオシン添加 TA10 Broth による様々な食品の培養を検討した結果、42℃ 8 時間培養することで、本キットで検出できる菌数まで大腸菌 O157 が増殖することを確認しております（p4 参考欄参照）。

本培地を使用すると、短時間で大腸菌 O157 を検出することができます。

*2: **TA10 Broth（商品コード：013908）はプリマハム㈱基礎研究所より販売しております。本培地にはノボビオシンナトリウムが添付されておりませんので別途ご用意ください。**

(1) <u>ノボビオシン添加 TA10 Broth</u>

精製水にTA10 Broth粉末を添加し、加温溶解後、ノボビオシンナトリウム水溶液を15 mg/Lとなるように添加し、121℃で15分間高圧蒸気滅菌します[*3]。ノボビオシンナトリウムは必ず高圧蒸気滅菌の前に添加してください。

*3: **TA10 Brothは、加熱により沈殿が生じますが、性能には問題ありません。**

(2) <u>通知法または ISO 法に準じる増菌用培地（mEC 培地、ノボビオシン加 mEC 培地、ノボビオシン加 mTSB 培地）</u>

通知法あるいはメーカーの指定の通りに作製してください。

3.試料の調製

被検食品を細切、混和した後、その 25 g をストマッカー袋に秤量して試料とします。

4.増菌培養

(1) <u>ノボビオシン添加 TA10 Broth による培養</u>

①ノボビオシン添加TA10 Brothを予め42±1℃に加温しておきます。

②ストマッカー袋中の試料25 gに対して、ノボビオシン添加TA10 Brothを225 mL加え、1分間ストマッカー処理を行います。

③ストマッカー袋ごと、42±1℃で、8時間培養します。

(2) <u>通知法またはISO法に準じた培養</u>

①ストマッカー袋中の試料25 gに対して、ノボビオシン添加TA10 Brothまたは通知法に準じた培地（mEC培地、ノボビオシン加mEC培地、ノボビオシン加mTSB培地）のいずれかの培地を225 mL加え、1分間ストマッカー処理を行います。

②ストマッカー袋ごと、42±1℃で、22±2時間培養します。

5.培養液の処理

(1) 培養終了後、ストマッカー袋をインキュベーターより取り出し、培養液の飛散に注意しながら、緩やかに攪拌します[*4]。

(2) 滅菌済みチップを用いて、培養液1 mLを滅菌済みチューブに分取し、添加液50 µLを加えます。

(3) チューブの蓋を閉め、ボルテックスミキサーで5秒間攪拌し、培養液と添加液が均一に混合されていることを確認します。

(4) ウォーターバスでは沸騰水（約100℃）で15分間、ヒートブロックでは100℃で15分間加熱します[*5]。

(5) 加熱後、室温まで冷却し、検査試料とします。

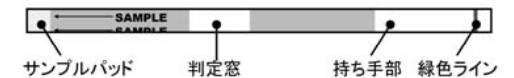
*4: **培養液の残りは、確定試験に使用する可能性があるため、試験終了まで滅菌せず保存してください。**

*5: **本キットは、試験者の安全確保のため、加熱済み培養液で試験を行います。必ず加熱処理を行ってください。**

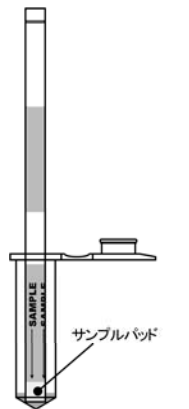
操作方法 2: テストストリップによる検査

テストストリップを冷蔵保存している場合には、袋のまま室温に戻してから使用してください。

(1) 室温まで冷却した検査試料をボルテックスミキサーで攪拌し、新しい滅菌済チューブ（2.0 mL）に 100 µL 分取します。

(2) テストストリップを透明プラ袋から取り出します[*6, 7]。

*6: **テストストリップは、吸湿の影響を受けますので、使用直前に袋から取り出してください。**

*7: **テストストリップは緑色のラインのある持ち手部を持ち、判定部分には触れないように注意してください。**

(3) テストストリップを(1)のチューブに入れ[*8]、そのまま静置します。

*8: **サンプルパッドの先端がきちんとチューブの底につくように入れてください。**

(4) 15 分後にテストストリップを取り出し判定します[*9]。

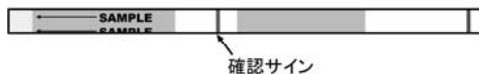
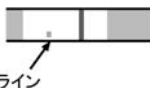
*9: **ピンク色の確認サインが発色していることを確かめてから判定してください。**

判　　定

●陽性：赤紫色の判定ラインとピンク色の確認サインの 2 本のラインが確認されます[*10]。

検査試料中に 1.0×10^4 CFU/mL 以上の大腸菌 O157 が含まれています。

*10: ラインの着色の濃さにかかわらず、赤紫色の判定ラインが確認できた場合は、陽性と判定してください。

●陰性：ピンク色の確認サインのみが発色し、判定ラインは確認されません。

検査試料中には、大腸菌 O157 が含まれていない、または、含まれている場合でも検出感度未満であると推測されます。

● 再検査：確認サインが発色しません。

確認サインが発色しなかった場合は、正しく検査が行われなかった可能性がありますので、判定を保留し、新しいテストストリップで再度検査を行ってください。

● 判定上の注意

(1) 正しい判定結果を得るために、テストストリップをチューブに挿入してから 15 分後に判定し、それ以降は判定を行わないでください。時間が経過すると非特異的な反応などで判定ラインが着色してくる場合があります。

(2) 粘性の高い食品や着色程度の高い食品では正確に判定できない場合がありますので、適宜希釈して検査を行ってください。

(3) 右図のように判定ラインの全体が着色せず、一部のみが着色した場合は、判定を保留し、新しいテストストリップで再度検査を行ってください。

判定ライン

(4) 本キットで陽性と判定された試料については、通知法や ISO 法などで、必ず確認試験を実施してください。

性　　能

1.検出感度

大腸菌 O157 標準菌株 3 株、分離菌株 1 株による試験の結果、1.0×10^4 CFU/mL 以上で検出できることを確認しています[*11]。

*11: 本キットの検出感度は、試料中の成分、微生物菌叢および汚染している大腸菌 O157 の損傷状態などの影響で変動する場合があります。

2.交差反応性

(1) 表1に示す菌株との交差反応は認められませんでした。

(2) 一部の *Citrobacter freundii* および *Salmonella* Urbana は、大腸菌 O157 と同一抗原を保有しているため、交差反応を示す可能性があります。

表 1　交差反応性

菌株	菌株番号	判定結果
Citrobacter freundii	PSC-Y230102	－
Citrobacter koseri	PSC-Y230201	－
Cronobacter sakazakii	NBRC102416	－
Edwardsiella tarda	NBRC105688	－
Enterobacter aerogenes	NBRC13534	－
Erwinia carotovora	IFO3380	－
Escherichia coli O111:H-	PSC-R010131	－
Escherichia hermannii	PSC-R010201	－
Escherichia hermannii	PSC-R010202	－
Hafnia alvei	PSC-Y460101	－
Klebsiella oxytoca	NBRC102593	－
Klebsiella pneumoniae subsp. *pneumoniae*	NBRC14940	－
Morganella morganii subsp. *morganii*	NBRC3848	－
Proteus vulgaris	PSC-R180201	－
Providencia alcalifaciens	NBRC105687	－
Pseudomonas aeruginosa	分離菌株	－
Salmonella Enteritidis	分離菌株	－
Serratia marcescens	PSC-R190101	－
Staphylococcus aureus	PSC-R090111	－
Yersinia enterocolitica	PSC-R030102	－

参　　考

ノボビオシン添加 TA10 Broth を使用した場合の大腸菌 O157 の検出

大腸菌 O157 を微量接種（5 CFU/25 g）した各種食品（牛肉、牛レバー、カイワレ大根、レタス、白菜の漬物、牡蠣、生卵、ナチュラルチーズ、グレープフルーツ、酢豚、ひじきの煮物）を検査いたしました。

本取扱説明書に記載された方法に従い、ノボビオシン添加 TA10 Broth を使用した増菌培養、さらに培養液の処理を実施し検査に供しました。

その結果、いずれの検査試料でも、本キットにより陽性と判定されました。また、大腸菌 O157 数は、42℃ 8 時間培養後に 5.0×10^4～5.4×10^6 CFU/mL でありました[*12]。

*12: 大腸菌 O157 の増殖は、食品に存在する微生物数や微生物叢により変動する場合があります。

使用上または取扱い上の注意

1.一般的な注意

(1) 本キットは食品からの大腸菌 O157 検出のための定性試薬ですので、他の用途には使用しないでください。

(2) 使用期限を過ぎた試薬は使用しないでください。使用期限は外箱および透明プラ袋に表示されています。

(3) 本キットは直射日光や熱源を避け、室温で検査してください。

(4) 廃棄方法は自治体の条例に従ってください。テストストリップ（PET など）および乾燥剤（パルプ）は、焼却処分が可能です。

素材：透明プラ袋（PE）、添加液チューブ（PP）、外箱・中仕切り（紙）、取扱説明書（紙）

2.操作上の注意

(1) 本キットの検出対象である大腸菌 O157 は、微量でも感染する可能性があります。また、大腸菌 O157 以外の微生物による感染の可能性もあるため、試験を実施する際には保護手袋、保護メガネ等を着用するなど、十分留意してください。

(2) 約 100℃で加熱しますので、取扱いは耐熱手袋などを着用し、やけどに十分注意してください。

(3) 加熱に使用する機器の空焚きに十分注意してください。

(4) テストストリップの入った透明プラ袋は、使用直前に開封してください。また、袋が破損している場合には、誤った結果となるおそれがありますので、そのテストストリップは使用しないでください。

(5) 検体の吸収が悪くなる場合がありますので、サンプルパッドには手を触れないでください。

(6) 使用前に判定紙がぬれてしまうと正しく判定できません。その際は、使用を中止し、新しいテストストリップを用いて検査してください。

3.危険防止上の注意

(1) 本キットの試薬類は、皮膚や粘膜、衣類等に付けないでください。

(2) 誤って試薬が目や口に入った場合には、直ちに水道水で十分に洗い流すなどの応急処置を行い、医師の診察を受けてください。

(3) 本キットによる試験実施後、身体に異常を感じた場合には、直ちに医師の診察を受けてください。

(4) 試験に使用した試料、増菌させた培地、使用済みのテストストリップ、使用後のチューブ、チップ等は、大腸菌 O157 汚染の可能性があると考え、取扱いには十分注意し、高圧蒸気滅菌などの適切な滅菌処理を行ってから廃棄してください。

4.その他

(1) 本キットの検査結果を使用した結果として発生した損害および損失については、責任を負いません。

貯法・使用期限

1.貯　　法　高温高湿を避けて室温（1～30℃）で保存してください。

2.使用期限　外箱、透明プラ袋等に表示

包装単位

20 テスト

発売元／お問い合わせ先：
プリマハム株式会社　基礎研究所
TEL:029-842-4333　FAX:029-842-5216

ESG01